昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2003，46（3）：282－287 ISSN 0454-6296

保幼激素及其代谢产物的HPLC分离方法的改进和应用

欧阳迎春[1]，李 胜[2*]

（1．中国科学院动物研究所，北京 100080；2．Department of Biological Science，Illinois State University，Normal，IL 61790-4120，USA）

摘要：传统的正相高效液相色谱（normal phase high performance liquid chromatography，NP-HPLC）可以较好地分离保幼激素（juvenile hormone，JH）Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ，但不能分离保幼激素的代谢产物及其类似物。经过改进的反相高效液相色谱（reverse phase high performance liquid chromatography，RP-HPLC）不仅可以很好地分离保幼激素，还能定性定量分析保幼激素的代谢产物及其类似物。离体培养昆虫咽侧体（corpora allata，CA）所合成的、被同位素标记的痕量保幼激素可以用以上两种色谱方法进行分离和鉴定。此外，RP-HPLC还可以用来分离体内或体外同位素标记的保幼激素代谢产物，以及测量血淋巴中的保幼激素滴度。

关键词：咽侧体；保幼激素；高效液相色谱；生物合成；代谢降解

中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）03-0282-06

Modification and application of a high performance liquid chromatography method to separate juvenile hormones and their metabolites

OUYANG Ying-Chun[1]，LI Sheng[2*]（1．Institute of Zoology，Chinese Academy of Sciences，Beijing 100080，China；2．Department of Biological Sciences，Illinois State University，Normal，IL 61790-4120，USA）

Abstract：Juvenile hormones（JH）Ⅰ，Ⅱ and Ⅲ can be effectively separated by traditional normal phase high performance liquid chromatography（NP-HPLC），but their metabolites and analogues can not be clearly separated by this method．We have recently modified a method of reverse phase high performance liquid chromatography（RP-HPLC）．This modified method can be used to separate not only different juvenile hormones，but also a variety of juvenile hormone metabolites and analogues，qualitatively and quantitatively．Trace amounts of radiolabeled juvenile hormone，which was synthesized and secreted by the *in vitro* incubated corpora allata（CA），could be separated by both NP-HPLC and RP-HPLC methods．Moreover，the RP-HPLC can be used to separate radiolabeled juvenile hormone metabolites and analogues，in both *in vivo* and *in vitro* conditions，as well as to measure juvenile hormone levels in the hemolymph．

Key words：corpora allata；juvenile hormone；high performance liquid chromatography；biosynthesis；metabolism

昆虫的内分泌器官咽侧体（corpora allata，CA）合成保幼激素（juvenile hormone，JH）并把它释放到血淋巴中，以维持幼虫的性状和促进成虫的生殖（Riddiford，1994；Wyatt and Davey，1996）。血淋巴中保幼激素滴度的变化是生物合成和代谢降解达到平衡后的结果。大多数昆虫只有JH Ⅲ存在，而鳞翅目昆虫的咽侧体除了合成JH Ⅲ外，还合成JH 0、Ⅰ、Ⅱ、B_3 等其它保幼激素（Gilbert *et al*.，2000）。保幼激素属于萜烯类化合物，与类固醇物质一样，是异戊二烯的衍生物，它们享有一个共同前体——焦磷酸法尼酯（farnesyl pyrophosphate）。以JH Ⅲ的生物合成和代谢降解为例，在鳞翅目昆虫中，法尼酸（farnesoic acid，FA）先环氧化生成保幼激素酸（juvenile hormone acid，JHA），再甲基化生成JH Ⅲ。而在其它昆虫中，法尼酸先甲基化生成甲基法尼酯（methyl farnesoate，MF），再环氧化生成JH Ⅲ。另外，其它几种保幼激素与JH Ⅲ的生物合成途径非常类似（Gilbert *et al*.，2000；Borst *et al*.，2001）。咽侧体离体合成保幼激素的能力一般用放射化学方法检测（Tobe and Pratt，1974；

基金项目：中国科学院知识创新工程重要方向项目（KSCX2-SW-105）

作者简介：欧阳迎春，女，1963年4月生，副研究员，研究方向为昆虫生理生化及昆虫内分泌学，E-mail：ouyangyc@panda.ioz.ac.cn

＊ 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：sli@ilstu.edu

收稿日期 Received：2002-08-16；接受日期 Accepted：2003-01-15

Pratt and Tobe，1974），其合成产物用薄层层析（thin layer chromatography，TLC）和正相高效液相色谱（normal phase high performance liquid chromatography，NP-HPLC）分离（Feyereisen and Tobe，1981；Cusson *et al*.，2000）。

在保幼激素的降解反应中，保幼激素酯酶（juvenile hormone esterase，JHE）是最为重要的一种水解酶，它把保幼激素降解成 JHA（Hammock and Sparks，1977）；另一种水解酶是保幼激素环氧水解酶（juvenile hormone epoxide hydrolase，JH-EH），它把保幼激素降解成保幼激素二醇（juvenile hormone diol，JHD），并把 JHA 降解成保幼激素酸二醇（juvenile hormone acid diol，JHAD）（Share and Roe，1988）。血淋巴中保幼激素的降解能力通常用萃取法检测，其代谢产物用 TLC 来分离（Share and Roe，1988；Hoffmann *et al*.，1994）。尽管 TLC 和 NP-HPLC 对实验设备要求低、所需时间短，但是精确度和灵敏度不高。Halarnkar 和 Schooley（1990）曾用反相高效液相色谱（reverse phase high performance liquid chromatography，RP-HPLC）分离保幼激素代谢产物。我们用改良的 RP-HPLC 方法，成功地分离咽侧体离体合成的保幼激素、保幼激素的代谢产物，以及测定血淋巴中的保幼激素滴度。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用昆虫为室内饲养的烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 和笨蝗 *Romalea microptera*，它们分别由 Dr. Francesco Pennacchio（Universita della Basilicata，意大利）和 Dr. David W. Borst（Illinois State University，美国）提供。

1.2 化学药品与试剂

L-[^{3}H-甲基]-蛋氨酸（比活 80.0 Ci/mmol）和[10-^{3}H(N)]-JH Ⅲ（比活 19.4 Ci/mmol）分别购于 Amersham 和 NEN 公司。JH Ⅰ、JH Ⅱ和 JH Ⅲ等标准品购于捷克的 SciTech 公司。TC199 培养液购于 Gibco BRL 公司。MF 为 Dr. Borst 提供。其它化学药品与试剂均购于 Sigma-Aldrich 公司。

1.3 咽侧体体外培养的放射化学方法

咽侧体体外培养的放射化学方法，按 Feyereisen 和 Tobe（1981）、Tobe 和 Pratt（1974）的方法，并加以改进。保幼激素的合成是以L-[^{3}H-甲基]-蛋氨酸的掺入来检测的。咽侧体在含有[^{3}H-甲基]-蛋氨酸的TC199 培养基液培养 4 h 后取出。用异辛烷提取释放到培养基中的^{3}H-JH，与作为内标的保幼激素标准品一起，在 HPLC 系统中分离。

1.4 保幼激素的离体降解和萃取方法

JHA、JHD 和 JHAD 标准品通过下列步骤化学转化。JH Ⅲ在含有 0.005 mol/L H_2SO_4 的甲醇∶1 mol/L NaOH = 1∶1 或三氢呋喃∶水 = 5∶3 的溶液中反应后转化成 JHA 或 JHD；JHAD 再由 JHA 或 JHD 转化而成（Halarnkar and Schooley，1990）。这些化学转化成的 JHA、JHD 和 JHAD 作为用 HPLC 分离保幼激素代谢产物的内标。

取 3 μL 血淋巴，用 600 μL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液稀释，并加入 4 000 ng JH Ⅲ和 200 000 DPM 的 ^{3}H-JH Ⅲ，离体条件下反应半小时，然后用 250 μL 甲醇终止反应。反应物先用 850 μL 丙酮提取，沉淀再用 850 μL 异辛烷提取 2 次，合并所有的上清液，4 000 r/min 离心 10 min。有机相异辛烷中含有未被降解的 JH Ⅲ，水相中含有 JH Ⅲ的代谢产物 JHA、JHD 和 JHAD。用 1 mL 乙酸乙酯抽提水相中的 JH Ⅲ代谢产物 3 次后，用于 HPLC 分离（Hoffmann *et al*.，1994，1995）。

1.5 保幼激素的体内降解和血淋巴中保幼激素的提取

检测体内保幼激素水解酶的能力：把 400 000 DPM 的[10-^{3}H(N)]-JH Ⅲ稀释在 100 μL 含有 0.1% 牛血清白蛋白的 Ringer's 液中，注射到昆虫体内，4 h 后，取 20 μL 血淋巴与 0.5 mL 乙腈、1 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液（PBS）和 3 mL 异辛烷充分混合。4 000 r/min 离心 10 min，水相中的保幼激素代谢产物再用 1 mL 乙酸乙酯提取 3 次后，用于 HPLC 分离。

血淋巴中保幼激素的提取：取 20 μL 血淋巴与 0.5 mL 乙腈、1 mL 0.1 mol/L PBS 和 3 mL 异辛烷充分混合。4 000 r/min 离心 10 min，保幼激素被有机相提取，进行 HPLC 分离。

1.6 HPLC 分离保幼激素及其代谢产物

LKB（Bromma）和 Pharmacia Biotech 两家公司的 HPLC 仪被分别用于 NP-HPLC 分离和 RP-HPLC 分离。

正相 HPLC 柱为 Altech Silica 柱（5 μm，250 mm × 4.6 mm）。流动相为正己烷∶乙醚 = 9∶1，流速 0.5 mL/min，洗脱时间为 20 ~ 30 min，洗脱组分的检测波长为 217 nm。按峰收集洗脱组分，然后进行液闪计数。

反相 HPLC 所用的柱子为 Altech Econosil C18 柱

(5 μm，4.6 mm×250 mm)。分离 JH，洗脱梯度为40%～100%的乙腈；分离 JHⅢ及其代谢产物，洗脱梯度为20%～100%的乙腈。洗脱时间为60 min，流速1.0 mL/min。洗脱组分的检测波长为217 nm。按每分钟收集洗脱组分，然后进行液闪计数。

保幼激素和保幼激素代谢产物的量是根据所收集的洗脱组分中同位素的量来推算的。

2 结果

2.1 体外咽侧体合成保幼激素的 HPLC 分离

体外培养烟芽夜蛾和笨蝗的咽侧体，用异辛烷提取释放到培养基中的^{3}H-JH，与作为内标的 JH Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ标准品一起，在 HPLC 系统中分离，收集的洗脱组分进行液闪记数。

图1显示用 NP-HPLC 分离 JH Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ的色谱图。用 NP-HPLC 分离烟芽夜蛾5龄第1天咽侧体合成的保幼激素，发现80%为 JH Ⅱ，16%为 JH Ⅰ，4%为 JH Ⅲ；分离笨蝗雌成虫第25天咽侧体合成的保幼激素，发现100%为 JH Ⅲ。

图2显示用 RP-HPLC 分离 JH Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ的色谱图。用 RP-HPLC 分离烟芽夜蛾咽侧体合成的保幼激素，93%为 JH Ⅱ，3%为 JH Ⅰ，4%为 JH Ⅲ；分离笨蝗咽侧体合成的保幼激素，全部为 JH Ⅲ。

2.2 保幼激素代谢产物的 HPLC 分离

血淋巴中的保幼激素经体内和体外降解后所得到的降解产物，与作为内标的，经 JH Ⅲ转化而来的 JHA、JHD 和 JHAD 一道，进行 HPLC 分离。

用 RP-HPLC 分离离体条件下血淋巴中的保幼激素的代谢降解产物的色谱图见图3。烟芽夜蛾离体血淋巴中保幼激素的代谢产物分别为84%的 JHA、5%的 JHAD 和11%的 JHD；JHAD 峰是根据同位素峰的出现并比较 Halarnkar 和 Schooley（1990）的色谱图推测得来。而笨蝗离体血淋巴中保幼激素的代谢产物，100%为 JHA。用同样的方法分离活体条件下的保幼激素代谢产物。烟芽夜蛾活体血淋巴中保幼激素的3种代谢产物的比例与离体条件下的结果相同；同样，检测笨蝗活体血淋巴中保幼激素的代谢产物，也只有 JHA。

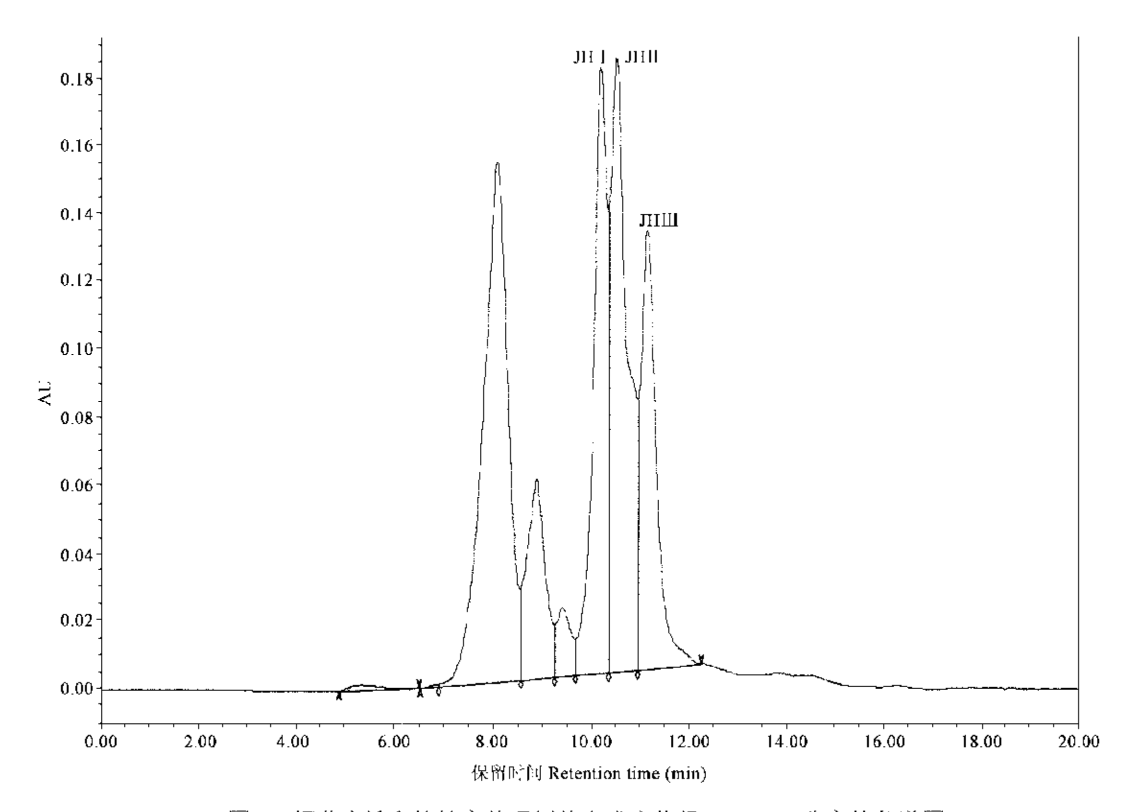


图1 烟芽夜蛾和笨蝗离体咽侧体合成产物经 NP-HPLC 分离的色谱图

Fig. 1 Separation of products released *in vitro* from corpora allata of *H. virescens* and *R. microptera* by NP-HPLC

由于离体咽侧体合成保幼激素的量很低，图中所显示的峰为保幼激素标样，离体咽侧体合成的保幼激素的量是根据所收集的洗脱组分中同位素标记的保幼激素量来推算的。图2、3亦同

Because juvenile hormone synthesis by corpora allata *in vitro* was very low，the peaks in the figure showed the juvenile hormone standards，so juvenile hormone synthesis by corpora allata *in vitro* was estimated by isotope labeled juvenile hormone in the collected fraction. The same for Fig. 2 and 3

图 2　烟芽夜蛾和笨蝗离体咽侧体合成产物经 RP-HPLC 分离的色谱图

Fig. 2　Separation of products released *in vitro* from corpora allata of *H. virescens* and *R. microptera* by RP-HPLC

图 3　烟芽夜蛾和笨蝗保幼激素代谢产物经 RP-HPLC 分离的色谱图

Fig. 3　Separation of juvenile hormone metabolites of *H. virescens* and *R. microptera* by RP-HPLC

2.3 RP-HPLC 用于血淋巴中保幼激素滴度的测定

用改良的 RP-HPLC 方法测定昆虫血淋巴中的保幼激素滴度，可以检测到少至 100 ng 的保幼激素。由于烟芽夜蛾的血淋巴保幼激素滴度很低，未能成功地检测烟芽夜蛾幼虫血淋巴中的保幼激素。但在笨蝗成虫的血淋巴中，保幼激素滴度较高（100～4 000 ng/mL），而且只有一种保幼激素——JH Ⅲ，故可以成功地加以检测。

3 讨论

3.1 NP-HPLC 和 RP-HPLC 的应用

除鳞翅目昆虫外，大部分昆虫的咽侧体只合成 JH Ⅲ（Gilbert *et al*.，2000）。要研究某一种昆虫的咽侧体合成哪几种保幼激素，以及它们之间的比例，通常用 HPLC 分离是最为准确而有效的方法。从图 1 和图 2 中可以看出，用 NP-HPLC 分离咽侧体合成的保幼激素，3 种保幼激素的洗脱峰互相重叠，尤其是 JH Ⅰ和 JH Ⅱ难以分开。而用 RP-HPLC 分离保幼激素，3 种保幼激素的洗脱峰不仅不相互重叠，而且每两洗脱峰之间相距 2～3 min，所收集的馏份也只含有单一的保幼激素成分。因此，分离鳞翅目昆虫的咽侧体合成产物，最好用 RP-HPLC，而分离其它昆虫的咽侧体合成的保幼激素，用 NP-HPLC 就足够了。

HPLC 的作用不仅是分离保幼激素，而且能够显著降低或者去除同位素背景，这在研究保幼激素合成速率很低的昆虫中尤为重要。[^{3}H-甲基]-蛋氨酸的极性很高，在 NP-HPLC 分离中，洗脱峰远落于保幼激素之后；而在 RP-HPLC 分离中，则在溶剂峰中洗出。这样在进行 RP-HPLC 分离时，所收集的保幼激素馏份中，就不含有任何［^{3}H-甲基］-蛋氨酸带来的同位素背景。烟芽夜蛾的 5 龄幼虫，除刚蜕皮时，保幼激素合成能力为 20～30 fmol/（h•pair）以外，其它时期均检测不到任何保幼激素合成。笨蝗雌成虫第 25 天咽侧体合成的保幼激素的能力高达 20～30 pmol/（h•pair），没有必要用 HPLC 来降低同位素背景，简单的萃取方法已经足够。总而言之，如果咽侧体合成保幼激素的能力很低，可以用增加培养咽侧体的数目、延长培养时间和改善培养基条件等来提高总的保幼激素合成量；培养基中较大量的[^{3}H-甲基]-蛋氨酸，可以提高被同位素标记的保幼激素合成量；再加上用 HPLC 降低[^{3}H-甲基]-蛋氨酸带来的同位素背景，这样即使咽侧体的保幼激素合成量较低也可以检测到。

3.2 保幼激素水解酶与保幼激素代谢产物

保幼激素水解酶主要是 JHE 和 JH-EH。保幼激素在这两种酶的作用下生成 JHA、JHD 和 JHAD。不同昆虫的血淋巴中，这两种保幼激素水解酶的比例变化很大。有些昆虫中只有 JHE，唯一的保幼激素代谢产物是 JHA；有些昆虫中只有 JH-EH，唯一的保幼激素代谢产物是 JHD；而有些昆虫既有 JHE，又有 JH-EH，保幼激素的代谢产物则为 JHA、JHD 和 JHAD 3 种，但因两种酶的比例不同，3 种保幼激素代谢产物比例的差异也很大（Share and Roe，1988）。从实验结果可以看出，笨蝗血淋巴中只存在一种保幼激素水解酶 JHE，而烟芽夜蛾血淋巴中存在两种保幼激素水解酶。

要研究血淋巴中保幼激素水解酶的活性，首先必须知道有哪几种保幼激素水解酶，或者哪几种保幼激素代谢产物。尽管 TLC 也能分离保幼激素及其代谢产物，但是分离效果并不理想（Hoffmann *et al*.，1994）；而我们用改良的 RP-HPLC 分离保幼激素代谢产物，效果非常好。有趣的是，在所研究的两种昆虫中，保幼激素水解酶的活性在离体条件下都是活体条件下的 10^4～10^5 倍。这可能是由于在活体条件下，绝大部分保幼激素与保幼激素结合蛋白相结合的结果，因此比较稳定，不容易被降解；而在离体条件下，保幼激素与保幼激素结合蛋白分离，从而极易被保幼激素水解酶降解。

3.3 血淋巴中保幼激素滴度的测定

分析血淋巴中保幼激素滴度大致有三种不同的方法：大蜡螟生测、放射免疫（radioimmunoassay，RIA）和气质联用（Bergot *et al*.，1981；Rembold and Lackner，1985；Englemann，1986；Cusson *et al*.，1997；Borst *et al*.，2000）。这三种方法各有优缺点：大蜡螟生测方法简单，但灵敏度不够；气质联用精确度和灵敏度都很高，但对仪器设备要求非常高；放射免疫应用相对较多，克服了以上两种方法的缺点，但是抗体制备比较困难，而且对 3 种保幼激素的识别能力不同。

关于用 HPLC 测定血淋巴中保幼激素滴度的报道较少，我们用改良的 RP-HPLC 测定笨蝗血淋巴中的保幼激素滴度，与用放射免疫测定的结果完全吻合（Borst *et al*.，2000）。我们认为，尽管用 RP-HPLC 可以测定保幼激素的滴度，但仍不如放射免疫方便和灵敏。如果需要知道保幼激素的种类和比例，可先用 HPLC 分离，再用放射免疫测定每一种

保幼激素的量。

参 考 文 献 （References）

Bergot B J, Ratcliff M, Schooley D A, 1981. Method for the quantitative determination of the four known juvenile hormones in insect tissue using gas chromatography-mass spectroscopy. *J. Chromatography*, 204: 231 – 244.

Borst D W, Eskew M R, Wagner S J, Shores K, Hunter J, Luker L, Hatle J D, Kecht L B, 2000. Quantification of juvenile hormone Ⅲ, vitellogenin, and vitellogenin-mRNA during the oviposition cycle of the lubber grasshopper. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30: 813 – 819.

Borst D W, Ogan J, Tsukimura B, Claerhout T, Holford K, 2001. Regulation of the crustacean mandibular organ. *Amer. Zool.*, 41: 430 – 441.

Cusson M, Laforge M, Miller D, Cloutier C, Stoltz D, 2000. Functional significance of parasitism-induced suppression of juvenile hormone esterase activity in developmentally delayed *Choristoneura fumiferana* larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 117: 343 – 354.

Cusson M, Miller D, Goodman W G, 1997. Characterization of antibody 444 using chromatographically purified enantiomers of juvenile hormone Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ: implication for radioimmunoassay. *Analyt. Biochem.*, 249: 83 – 87.

Englemann F, 1986. Endocrine regulated insect vitellogenesis: a synthesis. *Adv. Invert. Reproduction*, 4: 31 – 42.

Feyereisen R, Tobe S S, 1981. A rapid partition assay for routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. *Analyt. Biochem.*, 84: 372 – 375.

Gilbert L I, Granger N A, Roe R M, 2000. The juvenile hormone: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 30: 617 – 644.

Halamkar P P, Schooley D A, 1990. Reverse-phase liquid chromatographic separation of juvenile hormone and its metabolites, and its application for an *in vivo* juvenile hormone catabolism study in *Manduca sexta*. *Analyt. Biochem.*, 188: 394 – 397.

Hammock B D, Sparks T C, 1977. A rapid assay for insect juvenile hormone esterase activity. *Analyt. Biochem.*, 82: 573 – 579.

Hoffmann K H, Fibinger S C, Hoffmann G, 1994. Hemolymph juvenile hormone Ⅲ esterase activity during adult life of female and male crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 109A: 285 – 291.

Hoffmann K H, Lorenz M W, Braig W, 1995. Synthesis and degradation of juvenile hormone Ⅲ during the final two larval stages of female and male crickets, *Gryllus bimaculatus* de Geer (Ensifera, Gryllidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 112B: 355 – 360.

Pratt G E, Tobe S S, 1974. Juvenile hormones radiobiosynthesized by corpora allata of adult female locusts *in vitro*. *Life Science*, 14: 575 – 586.

Rembold H, Lackner B, 1985. Convenient method for the determination of picomole amounts of juvenile hormone. *J. Chromatography*, 323: 355 – 361.

Riddiford L M, 1994. Cellular and molecular actions of juvenile hormones. Ⅰ: general considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.*, 24: 213 – 273.

Share M R, Roe R M, 1988. A partition assay for the simultaneous determination of insect juvenile hormone esterase and epoxide hydrolase activity. *Analyt. Biochem.*, 169: 81 – 88.

Tobe S S, Pratt G E, 1974. The influence of substrate concentrations on the rate of insect juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of the desert locust *in vitro*. *J. Biochem.*, 144: 107 – 113.

Wyatt G R, Davey K D, 1996. Cellular and molecular actions of juvenile hormones. Ⅱ. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.*, 26: 1 – 156.